引文格式:黄智,周怀胜,许扬扬,胡丹,郑霄,张弛. 载汉防己甲素壳聚糖纳米微球的制备及其对人翼状胬肉细胞增殖的抑制作用[J]. 眼科新进展,2018,38(3):226-229,234. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0052

【实验研究】

载汉防己甲素壳聚糖纳米微球的制备及其对人翼状胬肉细胞增殖的抑制作用△

黄智 周怀胜 许扬扬 胡丹 郑霄 张弛

作者简介:黄智,男,1973年1月出生,广东韶关人,副主任医师。研究方向:眼表疾病。联系电话:18038866169;E-mail:hzhi@fsyyy.com;ORCID:0000-0002-9149-9817

About HUANG Zhi: Male, born in January, 1973. Tel: 18038866169; E-mail: hzhi@fsyyy.com; ORCID: 0000-0002-9149-9817

收稿日期:2017-07-04
修回日期:2017-10-10
本文编辑:付中静
△**基金项目**:佛山市科技计划项目(编号:2015AB00272)
作者单位:528000 广东省佛山市,佛山市第一人民医院眼科(黄智,胡丹,郑霄);528000 广东省佛山市,佛山市第一人民医院检验科(许扬扬);528000 广东省佛山市,佛山市第二人民医院眼科(周怀胜);528000 广东省佛山市,华厦眼科医院集团佛山华厦眼科医院(张弛)
通讯作者:张弛,E-mail:zhangc94@huaxiaeye.com;ORCID:0000-0002-0179-3386
Received date: Jul 4, 2017
Accepted date: Oct 10, 2017
Foundation item: Science and Technology Foundation of Foshan (No: 2015AB00272)
From the *Department of Ophthalmology, the First Pepole's Hospital of Foshan* (HUANG Zhi, HU Dan, ZHENG Xiao), *Foshan* 528000, *Guangdong Province, China*; *Department of Clinical Laboratory, the First Pepole's Hospital of Foshan* (XU Yang-Yang), *Foshan* 528000, *Guangdong Province, China*; *Department of Ophthalmology, the Second Pepole's Hospital of Foshan* (ZHOU Huai-Sheng), *Foshan* 528000, *Guangdong Province, China*; *Huaxia Eye Hosptial of Foshan, Huaxia Eye Hospitals Group* (ZHANG Chi), *Foshan* 528000, *Guangdong Province, China*
Responsible author: ZHANG Chi, E-mail: zhangc94@huaxiaeye.com; ORCID: 0000-0002-0179-3386

Preparation of chitosan nano-particles loaded tetrandrine and its inhibitory effects on the proliferation of human pterygium fibroblast cells

HUANG Zhi, ZHOU Huai-Sheng, XU Yang-Yang, HU Dan, ZHENG Xiao, ZHANG Chi

【Abstract】 **Objective** To investigate the inhibitory effects of chitosan nano-particles loaded tetrandrine (Tet) on proliferation of cultured pterygium fibroblasts. **Methods** The deoxycholic acid-modified chitosan (DAMC) derivative was synthesized through amidation reaction, and their properties were investigated. The viability of human pterygium fibroblasts (HPF) was evaluated by cell counting kit-8 (CCK-8) assay after cells were interacted with Tet/DAMC nano-particles on day 1, 3 and 5. **Results** The synthesized chitosan derivative and Tet formed drug-loaded nano-particles, and the agent-loading capacity was approximately 76%, and the sizes of agent-loaded nano-particles were 50 – 500 nm, with Zeta potential values being positive. The result of *in vitro* drug release experiment indicated that the nano-particles constantly released Tet in a controlled manner within 48 h. The viability of HPF in Tet group was (60.70 ± 2.30)%, (50.22 ± 2.35)%, (21.99 ± 2.07)% on day 1, 3, 5, respectively, but the corresponding data in Tet/DAMC group was (79.77 ± 2.09)%, (63.24 ± 2.83)%, (40.28 ± 1.19)%, respectively. The CCK-8 assay demonstrated that the Tet/DAMC nano-particles could inhibit HPF proliferation, and presented lower toxicity than Tet alone. **Conclusion** Chitosan nano-particles loaded tetrandrine exhibits a sustained agent-release behavior, which has obvious inhibitory effects on the proliferation of human pterygium fibroblasts, but its cytotoxicity is significantly lower than the original drug's, thereby possessing a great promise for improving the outcome of Tet for the prevention of pterygium recurrence.
【Key words】 tetrandrine; chitosan; nano-particle; pterygium

【摘要】 **目的** 通过制备新型载汉防己甲素的壳聚糖纳米微球,研究其对于人翼状胬肉细胞增殖的抑制作用。**方法** 化学合成新型壳聚糖衍生物(deoxycholic acid-modified chitosan, DAMC),与汉防己甲素作用合成载药纳米微球,并检测其性能。载药纳米微球作用体外培养的人翼状胬肉成纤维细胞第1天、3天、5天后,采用CCK-8法检测人翼状胬肉成纤维细胞的活性。**结果** 通过化学反应成功获得脱氧胆酸基团接枝的DAMC,可包载汉防己甲素药物,两者形成的载药纳米微球载药量较高,可高达76%。粒径50~500 nm,Zeta电位始终保持正电位。体外药物释放实验显示载药纳米微球缓释汉防己甲素可达48 h。细胞活性实验显示Tet组第1天、3天、5天细胞活性分别为(60.70 ± 2.30)%、(50.22 ± 2.35)%、(21.99 ± 2.07)%,而Tet/DAMC组分别为(79.77 ± 2.09)%、(63.24 ± 2.83)%、(40.28 ± 1.19)%,含10×10^{-6} mol·L^{-1}汉防己甲素的载药纳米微球具有抑制人翼状胬肉成纤维细胞的作用,且细胞毒性较原药明显降低。**结论** 载药纳米微球具有缓释药物的作用,对人翼状胬肉成纤维细胞的增殖具有明显的抑制作用,且细胞毒性较原药明显降低,有望提高汉防己甲素防治翼状胬肉复发的效果。
【关键词】 汉防己甲素;壳聚糖;纳米微球;翼状胬肉
【中图分类号】 R777.3

汉防己甲素(tetrandrine, Tet)是一种由中药防己、粉防己或千金藤中提取的化学物质,属于生物碱[1]。已有学者将其应用于抑制翼状胬肉术后复发的研究[2-5]。近年来,壳聚糖(chitosan)在药物的缓

释、控释及生物医用材料等方面的研究受到广泛的关注[3-5]。目前尚未见有关负载 Tet 的壳聚糖纳米载药体系的报道。本研究合成的载 Tet 壳聚糖纳米微球,载药量高,缓释时间长,并能有效抑制人翼状胬肉成纤维细胞增殖。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Tet(西安山川生物技术有限公司),壳聚糖(上海伯奥生物有限公司),1-乙基3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸(上海共价化学科技有限公司),脱氧胆酸(比利时 Acros 公司),细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8,CCK-8;日本 Dojindo 公司)。

1.1.2 人翼状胬肉成纤维细胞的培养 胬肉组织标本为佛山市第一人民医院眼科手术切除组织,采用组织块培养法培养人翼状胬肉成纤维细胞。将翼状胬肉组织碎块浸没入培养基中(10 mL 体积分数10%胎牛血清加入90 mL DMEM-F12 培养基),置于含体积分数5% CO_2 培养箱中培养,当成纤维细胞从组织块周围逐渐长出并相互接触后,进行传代。本实验取第3~6代成纤维细胞进行实验。

1.2 方法

1.2.1 脱氧胆酸接枝壳聚糖衍生物的化学合成 参考文献的合成方法[6],取2.0 g 壳聚糖混悬于10 g·L^{-1}醋酸溶液中,搅拌溶解。量取6.0 mL 无水乙醇,溶解1.3 g EDC·HCl [1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐]和1.6 g 的脱氧胆酸,滴入到壳聚糖溶液中,作用24 h。滴加乙醇/氨水溶液将溶液 pH 调节达弱碱性,所得液体离心(4500 r·min^{-1},15 min),去除上方液体,取下方沉淀物质。乙醇洗涤沉淀物三次,然后离心(4500 r·min^{-1},15 min),冷冻使沉淀物质干燥,得到新型壳聚糖衍生物(deoxycholic acid-modified chitosan,DAMC),名为脱氧胆酸基团接枝的 DAMC。利用 KBr(溴化钾)压片法测定红外光谱法(FTIR)图,分析 DAMC 的化学结构。

1.2.2 DAMC 载药纳米微球的制备及其载药性能测试 在3.0 mL 蒸馏水中加入10.0 mg DAMC,磁力搅拌使 DAMC 溶解;按表1中 Tet/DAMC 的配比称取 Tet,溶于0.4 mL 四氢呋喃中,逐滴加入 DAMC 液体中,再取1.0 mL 水,缓慢滴入反应液体中,在磁力搅拌下作用24 h。将上述反应液置于45 ℃水浴中,持续搅拌至四氢呋喃从溶液中完全蒸发。最后将溶液离心(4500 r·min^{-1},10 min),所得上清液即为载药壳聚糖纳米药物溶液。采用紫外分光光度法,在波长284 nm 下测出溶液中 Tet 的质量,按下面公式计算载药量:载药量=[(药物总质量-未负载药物质量)/DAMC 质量]×100%[6]。

1.2.3 Zeta 电位测定 按表1中 Tet/DAMC 的不同质量配比,分别为1∶5、2∶5、3∶5、4∶5、5∶5,制备不同载药量的 DAMC 载药纳米微球样品,Zeta 电位分析仪依次测定各样品的 Zeta 电位。

1.2.4 透射电子显微镜分析 将制备的样品滴到铜网膜上,晾干,将20 g·L^{-1}磷钨酸溶液滴加到样品上使其染色,晾干后再放置于透射电子显微镜下,观察不同载药量下纳米微粒的粒径和粒形情况。

1.2.5 体外释放实验 采用动态透析法对载药纳米微球进行体外药物释放实验(重复测量3次)。将表1中3.5 mL 的3号载药纳米微球溶液置于透析袋中,透析袋两端系紧,以200 mL 的 pH 6.2 PBS 缓冲液和乙醇的混合液(PBS 缓冲液/乙醇=80/20,v/v)作为释药介质[7],在(37.0±0.5)℃脱氧胆酸基团接枝的 DAMC,100 r·min^{-1}条件中进行体外释放实验。在不同时间点取出释药介质2.0 mL,再加入等量的同种介质。取出的介质溶液置于分光光度计中,在284 nm 波长下测定 Tet 含量,按下面公式计算纳米微球中 Tet 的累积释放百分率:药物释放率=(释放的药物质量/药物总质量)×100%[6]。

1.2.6 人翼状胬肉成纤维细胞的细胞活性测定 参考文献[3]选取 Tet 药物浓度为 10×10^{-6} mol·L^{-1}。取人翼状胬肉成纤维细胞以培养基制备 30×10^{6} L^{-1}细胞悬液,接种于96孔培养板,每孔加入100 μL 细胞悬液。24 h 后贴壁,弃去培养基,分别加入含 100×10^{3} U·L^{-1}青霉素和100 mg·L^{-1}链霉素培养基稀释的 DAMC,Tet,Tet/DAMC 纳米粒溶液,Tet 终浓度均为 10×10^{-6} mol·L^{-1},设置对照组,每组5个复孔。培养第1天、3天、5天后,弃去培养液,加入新的培养基及10 μL CCK-8,继续培3 h。在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值(λ=450 nm)。按下面公式计算细胞生存率:细胞生存率=实验组 A 值/对照组 A 值×100%[8]。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件分析数据,定量数据采用均数±标准差表示,计量资料采用 t 检验。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DAMC 的化学结构分析 壳聚糖、脱氧胆酸及 DACM 的 FTIR 图谱显示,与壳聚糖的图谱相比,DAMC 图谱中位于 1659×10^{-3} m^{-1}处和 1566×10^{-3} m^{-1}处出现酰胺基特征峰,DAMC 图谱中位于 1600×10^{-3} m^{-1}处氨基特征峰则消失,说明脱氧胆酸上的-COOH 通过酰胺化反应与壳聚糖上的-NH_2 进行了链接。另外脱氧胆酸图谱中 1708×10^{-3} m^{-1}处的特征峰完全消失,说明脱氧胆酸上的-COOH 已被取代。

2.2 DAMC 的载药性能 表1为 DAMC 纳米微球的载药量、Zeta 电位和粒径结果,Tet 的投入量对载药量有明显的影响,投入量增加,载药量也随之增加,逐渐升高至76%,Zeta 电位则呈相反的变化趋势,随着投入药物量的增加,Zeta 电位出现下降

的趋势。当载药量小于44%时,与空白纳米微球相比,载药纳米微球Zeta电位基本趋于稳定,变化不大,但随载药量的持续增加,Zeta电位开始出现明显降低。

图1中的透射电镜图片显示,当DAMC纳米微球未负载药物时,其微观形态为较均匀的球形或类球形,粒径约50 nm(图1A),随着Tet负载量的增加,DAMC载药纳米微球的粒径逐渐增大至50~150 nm、100~200 nm及300~500 nm(图1B-1D,表1)。

表1 DAMC载药纳米微球的载药量、Zeta电位及直径

序号	Tet/DAMC (W/W)	载药量/%	Zeta电位/mV	纳米微球直径/nm
1	0/5	0	14.50±0.43	30~50
2	1/5	10	13.99±0.46	50~150
3	2/5	26	11.81±0.42	100~200
4	3/5	44	10.72±0.62	200~250
5	4/5	61	5.92±1.07	250~300
6	5/5	76	5.26±0.64	300~500

图1 DAMC纳米微球负载药物前后的透射电镜照片。A:未负载Tet的DAMC纳米微球,B、C、D:分别为负载Tet量为10%、26%和76%的DAMC载药纳米微球

2.3 DAMC载药纳米微球的体外释放药物研究 选取了表1中3号DAMC载药纳米微球进行体外释放实验,释放行为如图2所示,药物的释放比较缓慢,早期存在突释现象,前8 h累积释放出的药物量约为释放总量的23.2%,之后药物释放趋于平缓,48 h后药物的释放基本停止,释放的药物量为释放总量的45.6%,说明纳米药物具有缓慢将药物释放的作用。

2.4 纳米微球对人翼状胬肉成纤维细胞的细胞活性的影响 Tet/DAMC纳米微球分别作用于人翼状胬肉成纤维细胞第1天、3天、5天后细胞活性结果表明(图3),随着药物作用时间的延长,Tet和Tet/DAMC对细胞增殖的抑制作用均逐渐增强,Tet组第1天、3天、5天细胞活性分别为(60.70±2.30)%、(50.22±2.35)%、(21.99±2.07)%,而Tet/DAMC组第1天、3天、5天细胞活性分别为(79.77±2.09)%、(63.24±2.83)%、(40.28±1.19)%,与Tet组相比,其抑制作用明显减弱,差异均有统计学意义(均为$P<0.05$)。

图2 DAMC载药纳米微球在体积分数20%乙醇,pH 6.2磷酸盐缓冲溶液中的释放曲线

图3 DAMC、Tet/DAMC纳米微球和Tet对人翼状胬肉成纤维细胞活性的影响。与对照组相比,$^{*}P<0.05$;与Tet组比较,$^{\#}P<0.05$

3 讨论

翼状胬肉是眼科临床的常见病和多发病,手术切除翼状胬肉是临床最常见和有效的治疗方法,但术后复发是眼科临床有待解决的难题之一。有研究表明 Tet 体外可以明显抑制血管内皮细胞的增殖、迁移和小管形成,具有明显抗血管形成的效应[9]。另外 Tet 可以直接抑制胬肉组织中 VEGF 的分泌[5],以及通过抑制钙离子通道,抑制翼状胬肉成纤维细胞的增殖[4]。眼局部给药常用的剂型是滴眼剂,但因药物在眼表保留的时间短(1~3 min),药物在眼表的利用率较低,只有通过频繁给药才能达到治疗的作用,一些药物经泪道黏膜吸收后可引起全身副作用[9-10]。因此,研发新剂型眼用药物,克服常规滴眼剂的不利因素,对于眼科疾病的治疗具有重要意义。

本研究中成功合成了脱氧胆酸接枝的新型壳聚糖衍生物,在水中通过简单的自组装即可形成纳米微球。本研究表明脱氧胆酸接枝的壳聚糖衍生物对 Tet 具有极佳的包载能力,随着投入药物量的增加,载药量呈现持续增加的现象,且最高时达到 76%。而其他纳米载药系统负载 Tet 的载药量在 35% 以下[11-12]。随着载药量的增加,DAMC 载药纳米微球的粒径也持续增加(图 1B-1D),但粒径保持在50~500 nm。研究表明[13],纳米粒粒径小于 250 nm 时,有利于纳米药物透过细胞屏障和细胞膜,提高药物利用率。表 1 中 3 号载药纳米微球粒径为 100~200 nm,粒径适中,载药量也较高,因此选取 3 号样品进行体外释放实验以及接下来的细胞实验。

本研究中 Zeta 电位的结果显示,DAMC 纳米微球带正电荷,负载 Tet 药物后,纳米微球仍带正电荷,随载药量的增加有所下降,但 Zeta 电位仍始终保持正值,说明大部分药物可能负载于胶束内部,这与 Pignatello 等[14] 和 Barbu 等[15] 报道的一致。纳米胶束表面带正电荷,这有利于与带负电荷的细胞膜相互作用,增强细胞对载药纳米胶束的摄取[16]。泪液的黏蛋白层中糖基侧链中含有大量 COO-和 SO_3-,使眼表表面附带负电荷[17],正负电荷的静电作用将有助于延长载药纳米微球眼表滞留时间,更好地发挥药物的治疗作用。

程国华等[11]合成的载 Tet 纳米药物体外缓释时间为 3 h,本研究结果显示载 Tet 的壳聚糖纳米微球具有缓慢持续释放药物的作用,且释放的时间可持续达 48 h。因此药物能够在眼表持续平稳释放,减少泪液循环带来的药物流失。而尚未释放出来的药物,可在体内通过溶菌酶的降解进一步释放出来[18]。

壳聚糖几乎无毒性,具有良好生物安全性。研究者[18]发现壳聚糖浓度为 2.0 g·L^{-1}时,仍未对结膜上皮细胞产生任何的毒性。细胞实验中,DAMC 纳米微球对翼状胬肉成纤维细胞的细胞活性未产生影响。表明其对细胞没有毒性,生物安全性良好。研究表明 Tet 具有抑制成纤维细胞的作用[19-20]。体外细胞实验显示 Tet 和 Tet/DAMC 均能抑制人翼状胬肉成纤维细胞的增殖,Tet 组第 1 天、3 天、5 天细胞活性分别为(60.70±2.30)%、(50.22±2.35)%、(21.99±2.07)%,而 Tet/DAMC 组分别为(79.77±2.09)%、(63.24±2.83)%、(40.28±1.19)%,可见随着药物作用时间的延长,Tet 和 Tet/DAMC 对细胞增殖的抑制作用均逐渐增强。而与 Tet 相比较,Tet/DAMC 的抑制作用减弱,即对细胞的毒性作用降低。这是由于纳米药物 Tet/DAMC 纳米微球具有缓释 Tet 药物的作用,因此作用于细胞的药物量减少,延长了 Tet 药物对人翼状胬肉成纤维细胞的抑制作用时间,同时也降低了药物对正常组织细胞的毒性作用。

综上所述,本研究合成的载 Tet 纳米药物具有高载药量,粒径适中,且缓释时间长等优点。细胞实验也显示具有抑制翼状胬肉成纤维细胞的作用,具有一定的研究应用前景。

参考文献

[1] ZHU X, SUI M, FAN W. *In vitro* and *vivo* characterizations of tetrandrine on the reversal of P-glycoprotein-mediated drug resistance to paclitaxel[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(3B): 1953-1962.

[2] 安美霞,吴开力,林少春. 初发和复发翼状胬肉成纤维细胞分泌基质金属蛋白酶的比较及汉防己甲素对其的影响[J]. 眼科新进展, 2011, 31(8): 708-710.
AN MX, WU KL, LIN SC. Comparison of matrix metalloproteinase secreted by primary and recurrent pterygium fibroblasts and inhibitory effect of tetrandrine[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2011, 31(8): 708-710.

[3] 安美霞,吴开力,林少春,潘竹娟. 汉防己甲素体外对正常结膜与翼状胬肉成纤维细胞抑制作用的比较[J]. 国际眼科杂志, 2011, 11(3): 397-399.
AN MX, WU KL, LIN SC, PAN ZJ, Comparison on inhibitory effects of tetrandrine hormone in vitro on normal conjunctiva and pterygium fibroblasts[J]. *Int Eye Sci*, 2011, 11(3): 397-399.

[4] 安美霞,吴开力,林少春,李岱,胡世兴,张艳丽. 汉防己甲素抑制翼状胬肉成纤维细胞增殖的研究[J]. 国际眼科志, 2007, 7(4): 934-937.
AN MX, WU KL, LIN SC, LI D, HU SX, ZHANG YL. Inhibitory effects of tetrandrine on pterygium fibroblasts[J]. *Int Eye Sci*, 2007, 7(4): 934-937.

[5] 安美霞,吴开力,林少春,胡世兴,张艳丽,杨新怀. 汉防己甲素对翼状胬肉成纤维细胞相关因子分泌的影响[J]. 眼科新进展, 2007, 27(8): 597-598.
AN MX, WU KL, LIN SC, HU SX, ZHANG YL, YANG XH. Inhibitory effect of tetrandrine on secretion of pterygium related genes[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2007, 27(8): 597-598.

[6] 吕瑞勤,朱家壁. 阿昔洛韦眼用壳聚糖纳米粒的制备及家兔生物利用度研究[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(1): 14-17.
LV RQ, ZHU JB. Acyclovir-laoded chitosan nanoparticles preparation and ocular drug bioavailability investigation[J]. *Pharm Clin Res*, 2007, 15(1): 14-17.

[7] LIU W, HU M, LIU W, XUE C, XU H, YANG X. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate[J]. *Int J Pharm*, 2008, 364(1): 135-141.

[8] LI XT, ZHANG Y, CHEN GQ. Nanofibrous polyhydroxyalkanoate matrices as cell growth supporting materials[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(27): 3720-3728.

(下转第 234 页)

平较高糖组显著下降,细胞活性显著提高,提示 ALA 对高糖条件下培养的 HLEC-B3 细胞有一定的保护作用,且该保护作用可能是通过上调 HLEC-B3 细胞中 MnSOD 的表达来实现的。另外本研究发现,ALA 对高糖诱导的氧化损伤的抵消趋势随药物浓度的增加而愈发明显,提示 ALA 对高糖条件下 HLEC-B3 细胞的保护作用可能呈一定的浓度依赖性,但其最适浓度范围仍需进一步研究。

综上所述,ALA 可有效抑制人晶状体上皮细胞内线粒体 ROS 的产生,增强其在高糖条件下的抗氧化损伤能力,对高糖条件下培养的人晶状体上皮细胞具有一定的保护作用。鉴于离体培养的细胞株与活体内晶状体上皮细胞仍有一定的差异,所以 ALA 在临床上具体的治疗效果和应用前景仍需进一步研究。

参考文献

[1] BABIZHAYEV MA. Mitochondria induce oxidative stress, generation of reactive oxygen species and redox state unbalance of the eye lens leading to human cataract formation: disruption of redox lens organization by phospholipid hydroperoxides as a common basis for cataract disease[J]. *Cell Biochem Funct*, 2011, 29(3): 183-206.

[2] ORRENIUS S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death[J]. *Drug Metab Rev*, 2007, 39(2-3): 443-455.

[3] LI N, RAGHEB K, LAWLER G, STURGIS J, RAJWA B, MELENDEZ JA, *et al*. DPI induces mitochondrial superoxide-mediated apoptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(4): 465-477.

[4] LI JM, SHAH AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 287(5): R1014-1030.

[5] LIU B, MA XH, GUO DD, GUO YY, CHEN NH, BI HS. Neuroprotective effect of alpha-lipoic acid on hydrostatic pressure-induced damage of retinal ganglion cells *in vitro*[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 526(1): 24-28.

[6] DING JY, KREIPKE CW, SPEIRS SL, SCHAFER P, SCHAFER S, RAFOLS JA. Hypoxia-inducible factor-1alpha signaling in aquaporin up regulation after traumatic brain injury[J]. *Neurosci Lett*, 2009, 453(1): 68-72.

[7] CHEN Y, YI L, YAN G, FANG Y, JANG Y, WU X, *et al*. Alpha-lipoic acid alters post-translational modifications and protects the chaperone activity of lens alpha-crystallin in naphthalene-induced cataract[J]. *Curr Eye Res*, 2010, 35(7): 620-630.

[8] CAGINI C1, LEONTIADIS A, RICCI MA, BARTOLINI A, DRAGONI A, PELLEGRINO RM. Study of alpha-lipoic acid penetration in the human aqueous after topical administration[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2010, 38(6): 572-576.

[9] XIE XF, BI HS, WU JF, YU TL. Study of TP's effect on the morphology of rat lens epithelium in high-glucose[J]. *J Tradit Chin Ophthalmol*, 2009, 19(3): 131-134.
解孝锋,毕宏生,吴建峰,于同利. 茶多酚对高糖条件下大鼠晶状体上皮细胞影响的研究[J]. 中国中医眼科杂志, 2009, 19(3): 131-134.

[10] OBERLEY TD. Mitochondria, manganese superoxide dismutase, and cancer[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2004, 6(3), 483-487.

[11] KASAHARA E, LIN LR, HO YS, REDDY VN. SOD2 protects against oxidation-induced apoptosis in mouse retinal pigment epithelium: implications for age-related macular degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(9): 3426-3434.

[12] LIU CL, OGANDO D, BONANNO JA. SOD2 contributes to anti-oxidative capacity in rabbit corneal endothelial cells[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 2473-2481.

(上接第 229 页)

[9] SAHOO S K, DILNAWAZ F, KRISHNAKUMAR S. Nanotechnology in ocular drug delivery[J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13(3/4): 144-151.

[10] ELJARRAT-BINSTOCK E, PE'ER J, DOMB AJ. New techniques for drug delivery to the posterior eye segment[J]. *Pharm Res*, 2010, 27(4): 530-543.

[11] 程国华,赵鑫,黄荣林. 汉防已甲素壳聚糖微球的制备和质量研究[J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(1): 47-50.
CHENG GH, ZHAO X, HUANG RL. Preparation and characteristics of tetrandrine chitosan microsperes[J]. *Chin JMAP*, 2008, 25(1): 47-50.

[12] 毕宏生,宋继科,吴建峰,卢秀珍,王兴荣,解孝锋. 眼科用汉防已甲素联合 5-氟尿嘧啶壳聚糖微球的制备及其质量评估[J]. 山东医药, 2010, 50(42): 1-3.
BI HS, SONG JK, WU JF, LU XZ, WANG XR, XIE XF. Preparation and characteristics of tetrandrine combined with 5-fluorouracil chitosan microspheres for ophthalmology[J]. *J Shandong Med*, 2010, 50(42): 1-3.

[13] CALVO P, VILA-JATO JL, ALONSO MJ. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers[J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(5): 530-536.

[14] PIGNATELLO R, BUCOLO C, FERRARA P, MALTESE A, PULEA A, *et al*. Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2002, 16(1-2): 53-61.

[15] BARBU E, VERESTIUC L, IANCU M, et al. Hybrid polymeric hydrogels for ocular drug delivery: nanoparticulate systems from copolymers of acrylic acid-functionalized chitosan and N-isopropylacrylamide or 2-hydroxyethyl methacrylate[J]. *Nanotechnology*, 2009, 20(22): 225108.

[16] NAM HY, KWON SM, CHUNG H, LEES Y, KWON SH, JEON H, *et al*. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles[J]. *J Control Release*, 2009, 135(3): 259-67.

[17] WADHWA S, PALIWAL R, PALIWAL SR, VYAS SP. Hyaluronic acid modified chitosan nanoparticles for effective management of glaucoma: development, characterization, and evaluation[J]. *J Drug Target*, 2010, 18(4): 292-302.

[18] DE CAMPOS AM, DIEBOLD Y, CARVALHO EL, SANCHEZ A, ALONSO MY. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems *in vitro* stability, *in vivo* fate, and cellular toxicity[J]. *Pharm Res*, 2004, 21(5): 803-810.

[19] 李万同,罗力生,柳大烈. 汉防己甲素对增生性瘢痕中成纤维细胞增殖和活力的影响[J]. 现代康复杂志, 2000, 4(1): 66-67.
LI WT, LUO LS, LIU DL. Effect of tetrandrine on fibroblasts derived from hypertrophic scar[J]. *Modern Rehabilit*, 2000, 4(1): 66-67.

[20] 秦力维,郭建巍,金婉容. 汉防已甲素对兔结膜成纤维细胞增生的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2002, 12(3): 125-128.
QIN LW, GUO JW, JIN WR. Effect of tetrandrine on proliferatin of rabbit conjunctival fibroblasts[J]. *J Tradit Chin Ophthalmol*, 2002, 12(3): 125-128.